

Например: 10 мл концентрата буфера для промывки + 90 мл дистиллированной воды.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Разведите образцы буфером для образцов (3) в соотношении 1:6, например, 200 мг или 200 мкл образца кала + 1.0 мл буфера для разведения образцов (3)
- Избегайте даже незначительного сдвига времени при внесении реагентов и образцов.
- Убедитесь в том, что промывочный буфер находится в лунках не менее 5 секунд за один цикл, и что оставшаяся жидкость полностью удалена при каждом цикле промывки.
- Избегайте попадания света на раствор субстрата ТМВ!

Выполнение процедуры

1. Перед началом тестирования все компоненты набора должны достичь комнатной температуры (22-25 °C). Аккуратно перемешайте, без образования пены.
2. Внесите по:
100 мкл положительного контроля «CONTROL +» (4)
100 мкл отрицательного контроля «CONTROL -» (5)
100 мкл разведенных образцов кала
3. Закройте планшет и инкубируйте **60 мин при 22-25 °C**.
4. Удалите жидкость декантированием, затем промойте каждую лунку **5 раз**, используя по **300 мкл** буфера для промывок (разведенного (2)) на лунку на один цикл промывки.
5. Внесите **3 капли (или 100 мкл) «CONJ HRP» (6)** в каждую лунку
6. Закройте планшет и инкубируйте **30 мин при 22- 25 °C**.
7. Удалите жидкость декантированием, затем промойте каждую лунку **5 раз**, используя по **300 мкл** буфера для промывок (разведенного (2)) на лунку на один цикл промывки.
8. Внесите **3 капли (или 100 мкл) «SUBSTR TMB» (7)** в каждую лунку
9. Закройте планшет и инкубируйте **10 мин при 22-25 °C** защищая от света.
10. Внесите **3 капли (или 100 мкл) «STOP» (8)** в каждую лунку, аккуратно перемешайте.
11. Считайте ОП при длине волны **450 нм** (длина волны сравнения ≥ 620 или 690 нм) с помощью микропланшетного ридера в течение 30 минут после остановки реакции.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Качественная оценка

Определение уровня «cut-off»:

ОП отрицательного контроля + 0.20

Образцы, для которых ОП равна или выше значения «cut-off» должны быть признаны положительными, а образцы, для которых ОП ниже значения «cut-off» должны быть признаны отрицательными на содержание *Entamoeba Histolytica*.

РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Serazym® Entamoeba Histolytica

Отрицательные	< Cut-off
Положительные	\geq Cut-off

Каждой лаборатории рекомендуется установить свои собственные референсные диапазоны нормальных и патологических значений, как это обычно делается для других диагностических параметров. Указанные выше референсные значения приводятся только как ориентировочные, которые можно ожидать.

Валидность теста

Данный тест считается действительным только в случае, если:

- Средняя ОП отрицательного контроля
 ≤ 0.20 (ручная процедура)
 ≤ 0.30 (автоматическая процедура)

- Средняя ОП положительного контроля
 ≥ 0.80

Если эти критерии не выполнены, результаты должны быть признаны недействительными, и тестирование должно быть повторено. Убедитесь, что процедура анализа выполняется корректно (соответствующие периоды инкубации и температуры, разведения образцов и буфера для промывок, этапы промывок и т.д.). В случае повторного невыполнения критериев достоверности обращайтесь к своему поставщику.

Ограничения метода

Нет корреляции между измеряемой ОП и тяжестью инфекции. Не допустимо проводить сравнение ОП, получаемых для образцов и для положительного контроля.

Перекрестная контаминация образцов и реагентов может приводить к ложноположительным результатам. Некорректные

разведения, недостаточно гомогенизированные образцы или твердые частицы в образцах, оставшиеся после центрифугирования, могут давать ложноотрицательные результаты. Ферментированные образцы со значением pH ниже 5 после ресуспендирования могут давать ложноотрицательные результаты. Образцы, обработанные формалином, могут давать ложноположительные результаты. Отрицательные результаты данного анализа не исключают инфекции *Entamoeba Histolytica*.

При интерпретации любых результатов исследований методом ИФА (ELISA) необходимо учитывать результаты микробиологических исследований и полную клиническую картину.

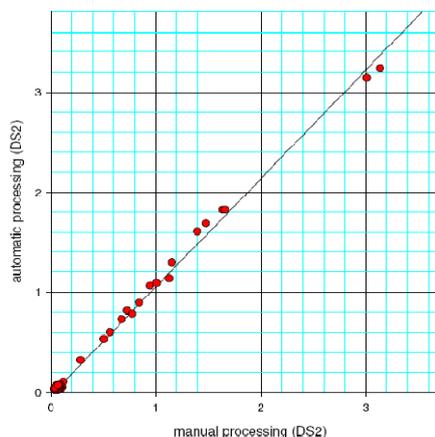
Автоматическая процедура

Постановка данного набора на полностью автоматизированных анализаторах может привести к завышенным результатам абсорбции по сравнению с ручными методиками из-за различий в процедурах промывки и техническим характеристикам оборудования. В этих случаях для негативного контроля допускается значение абсорбции 0.3. Рекомендуется использовать процедуру промывки 10 секунд с замачиванием на стрип, с промывками одна за другой и 10 с замачиванием после последней промывки в цикле. При необходимости число промывок можно увеличить с 5 до 7-8.

Корреляция:

Ручная - автоматическая процедура

Serazym® Entamoeba Histolytica Корреляция плотностей (n=140) r=0.998



ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Воспроизводимость

Коэффициент вариации внутри серии (CV) при тестировании данным методом Serazym® Entamoeba Histolytica рассчитан из анализа 12 повторов образцов:

Образец	Средняя ОП	Стандартное отклонение	CV (%)
1	1.841	0.137	7.5
2	1.208	0.078	6.5
3	0.620	0.040	6.4
4	0.463	0.024	5.3

Коэффициент вариации между сериями (CV) при тестировании данным методом Serazym® Entamoeba Histolytica рассчитан из анализа в 11 различных постановках по 3 повтора каждого образца:

Образец	Средняя ОП	Стандартное отклонение	CV (%)
1	2.720	0.128	4.7
2	1.647	0.122	7.4
3	0.968	0.074	7.7
4	0.409	0.019	4.6

Нижний предел обнаружения

Нижний предел обнаружения определяется путем титрования проб фекалий, в которые были введены трофозоиты культур. Нижний предел обнаружения составил:

5×10^3 – 6×10^3 трофозоиты на мл суспензии кала.

Специфичность

Было протестировано 160 образцов кала параллельно данным методом Serazym® Entamoeba Histolytica.

Все образцы дали отрицательный результат (OD < cut-off), соответствующий специфичности в 100 %.

Перекрестная реактивность

Образцы фекалий, положительные к одному из следующих кишечных паразитов, и, соответственно, другим патогенным микроорганизмам, не показали каких-либо перекрестных реакций в Serazym® *Entamoeba Histolytica*:

Ancylostoma duodenale, *Ascaris lumbricoides*, *Blastocystis hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba hartmanni*, *Giardia lamblia*.

Негативные образцы кала насыщались $\geq 10^8$ КОЕ микроорганизмами (см. табл. ниже) и протестированы с отрицательным результатом данным набором (<Cut-off).

<i>Aeromonas hydrophila</i>	(ATCC 7966)
<i>Bacillus cereus</i>	(ATCC 11778)
<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 6633)
<i>Bacteroides fragilis</i>	(ATCC 25285)
<i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)
<i>Campylobacter coli</i>	(ATCC 33559)
<i>Campylobacter jejuni</i>	(ATCC 33291)
<i>Citrobacter freundii</i>	(ATCC 8090)
<i>Clostridium sordellii</i>	(ATCC 9714)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(ATCC 13048)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(ATCC 13047)
<i>Enterococcus faecalis</i>	(ATCC 29212)
<i>Escherichia coli</i>	(ATCC 25922)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(ATCC 13883)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	(ATCC 27337)
<i>Proteus vulgaris</i>	(ATCC 8427)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC 10145)
<i>Salmonella enterica</i> Serovar enteritidis	(ATCC 13076)
<i>Salmonella enterica</i> Serovar typhimurium	(ATCC 14028)
<i>Shigella flexneri</i>	(ATCC 12022)
<i>Shigella sonnei</i>	(ATCC 25931)
<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 25923)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(ATCC 12228)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	(ATCC 17802)
<i>Yersinia enterocolitica</i> (O3, O9)	clinical isolates

СХЕМА ИНКУБАЦИИ – (См. Оригинал инструкции)

РЕКОМЕНДАЦИИ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Данный набор предназначен только для использования *in vitro*. Точно соблюдайте инструкции. Тестирование данным методом должно проводиться только квалифицированным персоналом.

Соблюдайте сроки годности, указанные на этикетках реагентов. Обращайте внимание и соблюдайте сроки стабильности разведенных реагентов.

Не используйте и не смешивайте реагенты различных лотов, за исключением буфера для образцов, буфера для промывок, раствора субстрата ТМВ и стоп-раствора.

Не используйте реагенты других производителей.

Не допускайте сдвига времени во время пипетирования реагентов.

Все реагенты должны храниться при 2... 8 °С перед использованием.

Некоторые реагенты содержат незначительные количества тимерозала (< 0.1 % w/v) и катона (1.0 % v/v) в качестве консервантов. Не допускайте их проглатывания или контакта с кожей или слизистыми оболочками.

Обращайтесь со всеми компонентами и образцами как с потенциально опасными.

Так как набор содержит потенциально опасные материалы, необходимо соблюдать следующие меры предосторожности:

- Не курите, не ешьте или не пейте при работе с материалами набора,
- Всегда используйте защитные перчатки,
- Никогда не пипетируйте материалы ртом,
- Обращайте внимание на меры предосторожности при работе с каждым отдельным компонентом набора.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com